

Afdeling Organische Contaminanten

1986-06-25

RAPPORT 86.36

Pr.nr. 505.0420

Onderwerp: Vergelijkend onderzoek
naar methoden voor de
bepaling van het gehalte
aan aflatoxine B1 in
veevoeder extracten.

Verzendlijst: directeur, sektorhoofd (2x), afd. Contaminanten (6x),
afd. Normalisatie, projektbeheer, leesportefeuille
sektoren/bibliotheek, Vereniging van Nederlandse
mengvoederfabrikanten (L.M. Breukink), Deelnemers
ringtest (zie adressenlijst).

RAPPORT 86.36

Pr.nr. 505.0420

Onderwerp: Vergelijkend onderzoek naar methoden voor de bepaling van
het gehalte aan aflatoxine B₁ in veevoeder extracten

Doel:

Het vergelijken van de resultaten verkregen via de door het RIKILT ontwikkelde methode met de resultaten verkregen via enkele andere gebruikte methodieken.

Samenvatting:

Door 11 laboratoria zijn vijf extracten van veevoerders onderzocht op het gehalte aan aflatoxine B₁.

De RIKILT methode is toegepast door 6 laboratoria, terwijl door 9 laboratoria alternatieve methoden toegepast zijn.

Conclusie:

- De resultaten van het ringonderzoek voldoen aan de eisen welke gesteld kunnen worden aan forensisch onderzoek op het µg/kg niveau.
- Er bestaat geen significant verschil tussen de resultaten verkregen met de RIKILT TLC-HPLC methode en resultaten verkregen met de overige methode.

Verantwoordelijk: L.G.M.Th. Tuinstra *TS*

Samenstellers : L.G.M.Th. Tuinstra, W.A. Traag *WAT*

Medewerkers : J.R. Besling, G. van den Bosch, H.P. van Egmond,
R.H. Groen, C. Janssen, C.A. Kan, F.J.E.M. Küppers,
E.J. Mulders, K.J. van Schalm

Projectleider : W.A. Traag

1. Inleiding

Naar aanleiding van de, per 1 januari 1984, verlaagde tolerantie, voor aflatoxine B1 in krachtvoeder, van 20 µg/kg naar 10 µg/kg werd in 1984 op het RIKILT een "workshop" gehouden waarbij de door het RIKILT ontwikkelde methode uitvoerig werd besproken. In vervolg op deze "workshop" en op verzoek van de Vereniging van Nederlandse Mengvoederfabrikanten is besloten een ringtest te organiseren.

Het doel van deze ringtest is nagaan hoe de resultaten van de in gebruik zijnde methoden overeenstemmen met de resultaten verkregen met de RIKILT TLC-HPLC methode.

2. Deelnemers

In bijlage 1 is een lijst gegeven van de aan de ringtest deelnemende laboratoria.

3. Beschrijving van de studie

Door het RIKILT werden een aantal ampullen bereid, gevuld met een chloroformextract van een veevoeder. De ampullen voor onderzoek volgens de RIKILT methode werden voorzien van kenmerk D terwijl de ampullen van de overige methoden werden voorzien van kenmerk G. De volgende materialen werden aan de deelnemende laboratoria verzonden:

1. standaardoplossing aflatoxine B1 in chloroform concentratie 1 µg/ml.

2. oefenmonster met een bekende aflatoxine B1 concentratie van 16 µg/kg. De ampul bevatte voor de RIKILT methode een extract overeenkomend met 1 gram veevoeder/5 ml en voor de overige methoden een extract overeenkomend met 10 gram veevoeder/5 ml.

3. Ampul 1,2,3,4,5. Elke ampul bevatte voor de RIKILT methode het extract van 1 gram veevoeder/5 ml en voor de overige methoden het extract van 10 gram veevoeder/5 ml.

Teneinde een slechte reproduceerbaarheid van de analyseresultaten, veroorzaakt door inhomogeniteit van de monsters, te voorkomen werden geen krachtvoerders aangeboden, maar extracten van krachtvoerders. De extractie is uitgevoerd met chloroform in aanwezigheid van water en celite volgens de gebruikelijke methode (1).

Ten behoeve van deze ringtest werden een aantal krachtvoerders met een aflatoxine B1 gehalte $< 1 \mu\text{g/kg}$ verzameld.

Deze krachtvoerders werden batchgewijs geëxtraheerd waarna de verzamelde extracten gehomogeniseerd werden. Aansluitend werd het gehomogeniseerde chloroformextract tienmaal geconcentreerd, opnieuw gehomogeniseerd en in vier porties verdeeld. De vier aldus verkregen identieke chloroformextracten werden gecontamineerd met aflatoxine B1 op een niveau van respectievelijk $16 \mu\text{g/kg}$ (oefenmonster), $9 \mu\text{g/kg}$ (ampul 1 en 4 = monster A), $15 \mu\text{g/kg}$ (ampul 2 en 5 = monster B) en $0 \mu\text{g/kg}$ (ampul 3 = blanco).

Voor de RIKILT methode werd een aliquot van de vier monsterextracten precies tienmaal verdund en uitgevuld in ampullen. Voor de overige methoden werden de ampullen rechtstreeks uit de vier monsterextracten gevuld.

Aan de deelnemende laboratoria zijn uitgebreide instructies met betrekking tot het uitvoeren van de ringtest gezonden. Naast het uitvoeren van de metingen is aan de deelnemers gevraagd een aantal grootheden, die de analyseomstandigheden mede karakteriseren, te rapporteren.

In bijlage 2 zijn een aantal formules, welke door de deelnemers daartoe gebruikt dienden te worden, weergegeven.

4. Toelichting op de toegepaste analysemethoden

In tabel 1 is een overzicht gegeven van de door de deelnemers gebruikte opwerkingsmethoden en meetomstandigheden.

In tabel 2 zijn de resultaten van het HPLC gedrag alsmede de resultaten van de lineariteitstest gegeven.

In kolom 2 van tabel 1 wordt een verwijzing gegeven naar de gebruikte opwerkings- c.q. zuiveringsmethoden welke hieronder kort beschreven worden.

Methode 1 :

RIKILT-TLC-HPLC methode (uitvoerig voorschrift aan alle deelnemers verzonden)

Methode 2 :

Het extract wordt gezuiverd over een kolom bestaande uit $\text{Na}_2\text{SO}_4/\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3$ (zuur)/ Na_2SO_4 .

Na opbrengen van het extract wordt de kolom gewassen met ijsazijn/tolueen (1:9 v/v) en ether/hexaan (2:3 v/v). Elutie vindt plaats met methanol/dichloormethaan (5:95 v/v). Na derivatisering met trifluor azijnzuur wordt het aflatoxine B₁ gehalte vloeistof chromatografisch bepaald.

Methode 3 :

Het extract wordt gezuiverd over een Baker silicagel kolom. Na concentreren wordt een aliquot gederivatiseerd met trifluorazijnzuur waarna het aflatoxinegehalte vloeistofchromatografisch wordt bepaald.

Methode 4 :

Het extract wordt gezuiverd over een silicagel kolom. Na opbrengen van het extract wordt de kolom gewassen met ijsazijn/tolueen (1:9 v/v), hexaan en ether. Elutie vindt plaats met dichloormethaan/aceton (6:1 v/v). Na concentreren wordt het extract, direct vloeistofchromatografisch bepaald.

Methode 5 :

Principe conform methode 3 waarbij voorzuivering plaats vindt door middel van silicagel 60.

Methode 6 :

Zie methode 3.

Methode 7 :

Duitse GPC-TLC methode. Uitvoerig voorschrift aan alle deelnemers verzonden.

Methode 8 :

Het chloroform extract wordt gezuiverd via een Seppak florisil kolom gevolgd door een Seppak C18 kolom. Van het eluaat, 50 ml acetone/H₂O 15:85, wordt 250 µl geïnjecteerd in het HPLC systeem conform methode 1.

Methode 9 :

Zie methode 5.

Bij deze methode wordt bij de HPLC analyse gebruik gemaakt van de volgende gradiënt:

0 min.	CH ₃ CN/H ₂ O	(20:80 v/v)
6 min.	CH ₃ CN/H ₂ O	(27:73 v/v)
11 min.	CH ₃ CN/H ₂ O	(30:70 v/v)

In kolom 3 van tabel 2 is per deelnemer, althans wanneer de TLC-HPLC methode is gebruikt, het schotelgetal voor de gebruikte kolom gegeven.

Uit vroegere experimenten was gebleken dat voor een voldoende scheiding van aflatoxine B1 en eventuele matrix componenten een schotelgetal van minimaal 2000 nodig was, uitgaande van een voldoende selectiviteit en juiste eluens samenstelling. Ook nu weer is gebleken dat het schotelgetal geen goede maat is om het scheidend vermogen van een systeem voor bepaalde componenten aan te geven.

Voor een juiste kwantificering zowel uitgaande van de piekhoogte als piekoppervlak is een symmetrische piek noodzakelijk. Een maat voor de symmetrie is de symmetriefactor (kolom 4). Ervaring heeft geleerd dat deze factor minimaal 0,6 dient te bedragen.

In kolom 5 is de responsverhouding van de bij de ringtest meegeleverde standaard en de door de deelnemers gebruikte eigen standaard vermeld. Grote afwijkingen van 1,0 zullen uiteraard resulteren in grote afwijkingen in het analyseresultaat.

In kolom 6 is de range aangegeven waarbij het lineaire gedrag van het systeem door de deelnemers is getest. De lineariteitstest is als volgt geëvalueerd:

De gemeten piekhoogte c.q. piekoppervlakte is gedeeld door de geïnjecteerde hoeveelheid aflatoxine B1 (R/M). Wanneer dit quotient grafisch uitgezet wordt tegen de hoeveelheid geïnjecteerde aflatoxine B1 dient bij een goed lineair verband een horizontale rechte verkregen te worden. In fig. 1 is een voorbeeld gegeven. Per meetpunt wordt de verhouding van de respons en de geïnjecteerde hoeveelheid berekend (R/M). Door het gemiddelde van de berekende R/M waarde (minimaal 4 meetpunten) wordt een horizontale rechte getrokken. Wanneer de (R/M) waarden van de individuele meetpunten niet meer afwijken dan $\pm 10\%$ van de horizontale rechte is het systeem lineair.

4.1 Opmerkingen ten aanzien van de toegepaste methodiek en HPLC gedrag

- Uit tabel 1 en 2 blijkt dat van de 11 deelnemende laboratoria er vier twee methoden hebben toegepast nl. de RIKILT TLC-HPLC methode en een binnen dat laboratorium routinematig gebruikte methode.

In totaal is door slechts zes deelnemende laboratoria de RIKILT-TLC HPLC methodiek toegepast.

- Door op één na alle laboratoria zijn lineariteitstests uitgevoerd (zie ook tabel 2). Gesteld kan worden dat het lineaire gedrag zeer goed is m.u.v. laboratorium 2 (methode 2).
- In tabel 2 is in kolom 3 het schotelgetal vermeld van die deelnemers welke de RIKILT methode hebben toegepast. Opvallend is het grote verschil tussen de gemeten waarden.
- De in tabel 2 in kolom 4 gerapporteerde symmetriefactoren zijn redelijk goed m.u.v. laboratorium 2 waar asymmetrische pieken worden verkregen (tailing). Ook werd door deze deelnemer een laag schotelgetal gevonden. Regenereren van de gebruikte kolom bleek niet te helpen. Een mogelijke oorzaak zou het gebruik van een reactiespiraal met een te grote inwendige diameter kunnen zijn, namelijk 1,0 mm in plaats van 0,5 mm.
- Door laboratorium 2 werd gerapporteerd dat de fluorescentie van het met jodium gederivatiseerde aflatoxine B₁ beduidend lager is dan de fluorescentie van het, pré-column, met TFA gederivatiseerde aflatoxine B₁.
- Laboratorium 4 rapporteerde een verbeterde pieksymmetrie door de monsters op te nemen in het eluens i.p.v. methanol.

5. Statistische bewerking

De ingezonden resultaten zijn volgens ISO 5725 (2) per component en per monster met de computer verwerkt. Met de Cochran test zijn de duploverschillen en met de Dixon test de duplo gemiddelden van de laboratoria getoetst.

Het programma meldt bij de Dixon en de Cochran test "stragglers" en "outliers".

De kans dat een straggler ten onrechte als een afwijkende waarde wordt beschouwd is 1 tot 5%. Bij een "outlier" is deze kans < 1%.

Resultaten/Discussie

In tabel 3 zijn de resultaten verkregen met de RIKILT TLC-HPLC methode statistisch verwerkt. Aansluitend zijn de resultaten verkregen met de overige methoden statistisch verwerkt. In tabel 4 zijn deze resultaten vermeld.

De variatie coëfficiënt bedraagt voor de monsters, ongeveer 20 à 40% uit tabel 3 en 4 blijkt dat met de TLC-HPLC methode (tabel 3) de variatie coëfficiënt, alhoewel niet significant, hoger is dan de variatie coëfficiënt van de overige methoden (tabel 4), waarbij dan wel bedacht moet worden dat het aantal analyseresultaten verkregen met diverse methoden nogal uiteen loopt.

Daarom zijn alle ingezonden resultaten nog eens tezamen statistisch verwerkt.

In tabel 5 zijn de gegevens gerangschikt per monster alsmede het gemiddelde, de herhaalbaarheid (r) en de reproduceerbaarheid (R). Bovendien wordt de reproduceerbaarheidsvariatiecoëfficiënt gegeven (VC). Door laboratorium 4 zijn duplowaarden ingezonden. In tabel 5 is het gemiddelde van deze duplowaarden vermeld.

Opvallend is het goede resultaat (tabel 5) wat geboekt wordt, door alle deelnemers, met het oefenmonster nl. een gemiddelde waarde van 16.52 met een variatie coëfficiënt van 9,5%. Wanneer dit resultaat vergeleken wordt met de "echte" monsters, welke bereid waren uit hetzelfde extract, vallen de resultaten met bedoelde monster verkregen des te meer op. Alhoewel de gevonden variatie coëfficiënten vrij hoog zijn, liggen de gevonden waarden in de lijn der verwachtingen (3). Ook ligt deze waarde in de orde grootte van de in de EEG methode gestelde eis voor de reproduceerbaarheid van de resultaten tussen laboratoria.

Conclusie

- De resultaten van het ringonderzoek voldoen aan de eisen welke gesteld kunnen worden aan forensisch onderzoek op het µg/kg niveau.
- Er bestaat geen significant verschil tussen de resultaten verkregen met de RIKILT TLC-HPLC methode en resultaten verkregen met de overige methoden.

Literatuur

1. Publikatieblad nr. L 102/8-18 (15.04.76) van de Europese Gemeenschappen. Zevende richtlijn van de commissie van 1 maart 1976 houdende vaststelling van gemeenschappelijke analysemethoden voor de officiële controle van diervoeders (76/372/EEG).
2. ISO 5725 Precision of test methods - Determination of repeatability and reproducibility by inter-laboratory test. First edition 1981-04-01.
3. Horowitz, W.J. AOAC 60 (1977) 1355-1363.

Lijst van deelnemers

Zuivelcontrole instituut, Postbus 250, 3830 AG Leusden

Keuringsdienst van Waren, Postbus 372, 8901 BD Leeuwarden

Hendrix voeders b.v., Postbus 1, 5830 MA Boxmeer

Coöperatief Centraal Laboratorium, NCB-laan 52, 5462 GE Veghel

Trouw en Co. B.V. int., Nijverheidsweg 2, 3881 LA Putten

Centrum voor Onderzoek en Voorlichting voor de Pluimveehouderij,
Spelderholt 9, 7361 DA Beekbergen

Rijks-Kwaliteitsinstituut voor Land- en Tuinbouwprodukten,
Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen

Wessanen Mengvoeders B.V., Postbus 630, 1500 EP Zaandam

Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiëne, Postbus 1,
3720 BA Bilthoven

Centraal Instituut voor Voeding Onderzoek, Postbus 360,
3700 AJ Zeist

Keuringsdienst van Waren Rotterdam, Baan 74, 3011 CD Rotterdam

Formules voor de berekening van een aantal parameters en minimumeisen

$$\text{- Schotelgetal: } N = 5.54 \left(\frac{tr}{Wl/2} \right)^2$$

tr = retentietijd (mm)

$Wl/2$ = piekbreedte op halve hoogte (mm)

$$\text{- Symmetriefactor} = (a/b)^2$$

a en b worden gemeten op 10% van de piekhoogte waarbij a loopt van het voorfront van de piek tot aan de loodlijn uit de top en b loopt van de loodlijn tot aan het achterfront van de piek.

- Het schotelgetal moet zijn > 2000 .

- De symmetriefactor moet zijn $> 0,6$.

Tabel 1. Samenvatting van de door de deelnemers toegepaste opwerkingsmethode en meetomstandigheden.

Lab no.	Opwerkings- methode	HPLC kolom	Eluens	Flow (ml/min)	Deriva- tisering	Detectie
1	1	lichrosorb 5RP 18 - 150x4,6 mm	CH ₃ CN/H ₂ O (60:40 v/v)	0,5	post	fluor 365- 418 nm
2	1	2x Cp-TM-spher 8C18 - 100x3,0 mm	CH ₃ CN/H ₂ O (35:65 v/v)	0,5	post	fluor 365- 428 nm
2	2	„ „	CH ₃ CN/CH ₃ OH/H ₂ O (16:5:79 v/v)	1,0	pré	fluor 360- 440 nm
3	3	Reversed phase 5 of 10 µm-250x4,6 mm	CH ₃ CN/CH ₃ OH/H ₂ O (70:90:340 v/v) (pH=4,0) of azijnzuur 1%:CH ₃ CN(85:25 v/v)	n.g	pré	fluor 365- 440 nm
4	1	lichro chart 7 RP 18 - 250x4,0 mm	CH ₃ CN/H ₂ O (45:155 v/v)	1,0	post	fluor 366- 416 nm
4	4	lichrosorb silicagel 5 µm 250x4,0 mm	Tolueen/acetone/ethylacetaat/mierzuur (920:56:50:40 v/v)	1,4	nee	fluor 366- 419 nm
5	5	reversed phase 10 RP 18 - 250x4,6 mm	CH ₃ CN/CH ₃ OH/H ₂ O (18:21:61 v/v)	n.g	pré	fluor N.G
6	6	lichrosorb 10 RP 18	CH ₃ CN/H ₂ O gradiënt	1,5	pré	fluor 363- 440 nm
7	1	2x Cp-TM lichrosorb RP18 100x3,1 mm	CH ₃ CN/CH ₃ OH/H ₂ O (40:70:130 v/v)	0,5	post	fluor 360->420 nm
7	7	nvt	nvt	nvt	nee	nvt
8	3	Perkin-Elmer RPHS 3C18 n.g	CH ₃ OH/H ₂ O (47:53 v/v)	1,1	pré	fluor 375- 440 nm
9	1	lichrosorb 5RP18 150x4,6 mm	CH ₃ CN/H ₂ O (35:65 v/v)	0,5	post	fluor 360->420 nm
9	8	„ „ „	CH ₃ CN/CH ₃ OH/H ₂ O (40:70:130 v/v)	0,5	post	fluor 360->420 nm
10	9	lichrosorb 5RP18 125x4,6 mm	gradient (zie tekst 4.1)	1,5	pré	fluor 362- 432 nm
11	1	Cp-TM spher 8C18 100x3,1 mm	CH ₃ CN/H ₂ O (65:35 v/v)	0,5	post	fluor 360- 418 nm

n.g = niet gerapporteerd.

Tabel 2. Resultaten HPLC gedrag en lineariteitstest.

Lab no.	Methode	Schotel getal (systeem)	Symmetrie factor	Gem. verhouding RIKILT st./ Eigen st.	Range (Pg) lin. test	Max. afwijking van de piekhoogte st. cq. opper- vlak geïnject. massa %
1	1	4100	0,7	0,80	50-300	5
2	1	660	0,5	0,83	50-300	7
2	2	*	*	ca. 0,80	50-300	16
3	3	*	*	0,91	250-4000	10
4	1	13850	1,0	0,87	50-300	6
4	4	*	*	0,83	50-300	7
5	5	*	*	0,98	50-250	4
6	6	*	*	1,25	N.G	N.G
7	1	5445	0,7	0,92 ¹⁾	80-450	5
7	7	*	*	0,84 ¹⁾	1000-4000	11
8	3	*	*	N.G	20-160	12
9	1	3267	1,0	0,85	50-300	5
9	8	*	*	0,85	100-1000	6
10	9	*	*	0,95	50-300	2
11	1	1180	0,9	0,92	50-300	9
						gem = 7,5 Sd = 3,72

* alleen voor de RIKILT methode zijn data gerapporteerd.

1) de bij de ringtest meegeleverde standaard is vergeleken met een door het RIVM geleverde standaard.

n.g = niet gerapporteerd.

Tabel 3. Resultaten aflatoxine B₁ in µg/kg ringtest (RIKILT methode).

Lab no.	Oefen monster	Monster A		Monster B	
1	16,3	7,5	7,6	11,8	12,0
2	14	0,7	1,5*	1,8	2,3*
4	17,3	19,4	11,8**	21,2	17,3
7	16,2	6,7	8,4	11,2	9,7
9	19,1	8,0	8,6	14,1	16,3
11	16,2	7,9	6,4	11,6	8,8
Gem.	16,52	9,23		13,40	
r	---	7,11		4,91	
R	4,71	11,32		11,37	
VC(R)%	10,1	43,3		30,0	
N	6	5		5	

* Kleiner dan 1/5 deel van het totaalgemiddelde niet in de berekeningen opgenomen.

** Straggler volgens de Dixontoets en volgens de Cochran-toets. (niet verwijderd).

Tabel 4. Resultaten aflatoxine B1 in µg/kg ringtest (overige methoden).

Lab no.	Oefen monster	Monster A		Monster B	
2	18	8,0	10,0	12,0	18,0
3	17,4	9,0	9,5	17,0	15,5
4	16,9	19,4	10,6	21,0	16,0
5	15,5	7,0	7,3	12,8	11,1
6	17,7	13,3	10,5	20,0	*
7	18,6	10,5	5,8	11,2	11,4
8	21,0	11,0	8,0	17,0	17,0
9	18,2	8,8	8,3	13,9	13,1
10	17,5	9,9	8,0	14,6	13,5
Gem.	18,87	9,72		15,01	
r		7,44		5,83	
R	4,71	8,49		8,71	
VC(R)%	7,8	30,9		20,5	
N	9	9		9	

* Analyse mislukt.

Tabel 5. Resultaten aflatoxine B1 in µg/kg ringtest (alle resultaten).

Lab no.	Oefen monster	Blanco	Monster A		Monster B	
1	16,3	1,3	7,5	7,6	11,8	12,0
2	14	-	0,7	1,5*	1,8	2,3*
2	18	1	8,0	10,0	12,0	18,0
3	17,4	1,5	9,0	9,5	17,0	15,5
4	17,3	2,8	19,4	11,8	21,2	17,3
4	16,9	2,5	19,4	10,6	21,0	16,0
5	15,5	<1	7,0	7,3	12,8	11,1
6	17,7	<0,5	13,3	10,5	20,0	**
7	16,2	<1	6,7	8,4	11,2	9,7
7	18,6	<1	10,5	5,8	11,2	11,4
8	21	0	11,0	8,0	17,0	17,0
9	19,1	-	8,0	8,6	14,1	16,3
9	18,2	1,0	8,8	8,3	13,9	13,1
10	17,5	<2	9,9	8,0	14,6	13,5
11	16,2	-	7,9	6,4	11,6	8,8
Gem.	17,33		9,58		14,41	
r	---		7,38		5,50	
R	4,65		9,27		9,66	
VC(R)%	9,5		34,2		23,7	
Gedoseerd niveau µg/kg	16	0	9		15	

* Kleiner dan 1/5 deel van het totaal gemiddelde niet in de berekeningen opgenomen.

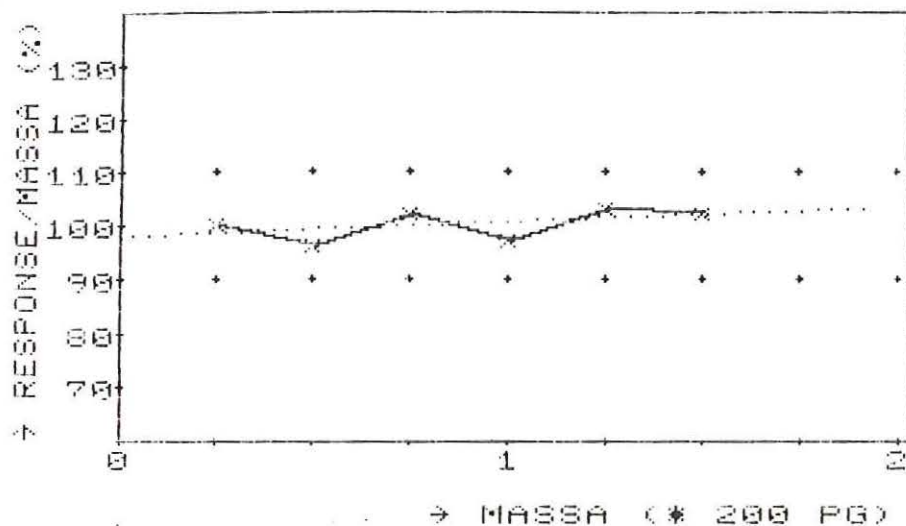
** Analyse mislukt.

LINEARITEIT Aflatoxine B1 sept 1985
HPLC - Fluorescentie
oppervlak in mm²
Interne standaard : geen
Kolom 8 RP 18 nr. -
Injectievolume 20 ul, attenuation -
Oven: -

figuur 1

st	factor	oppervlak komponent	oppervlak int. st.	r/m %
1	.25	15.2		100
2	.5	29		96
3	.75	46.1		102
4	1	58.8		97
5	1.25	78.1		103
6	1.5	92.4		102

r/m % is de relatieve response/massa
tov de gemiddelde response/massa.



Correlatiecoefficient = .998917728